

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770214

研究課題名 (和文) ミトコンドリア分裂実行因子 Drp1 膜分裂サイト集積化機構の解明

研究課題名 (英文) Targeting mechanism of Drp1 to mitochondrial fission sites

研究代表者

大寺 秀典 (OTERA HIDENORI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40380612

研究成果の概要 (和文)：

ミトコンドリアは融合・分裂により形態を維持し、細胞骨格に沿って細胞内に適切に配送・配置され細胞内エネルギー産生、カルシウムシグナル伝達、アポトーシスに重要な役割を果たす。ミトコンドリアの分裂は、細胞内の必要な場所にミトコンドリアを適切に配置するために必要であり、特に極性を有する神経細胞、あるいは免疫細胞などの機能発現に必須な反応であると考えられている。高分子量GTPaseであるDrp1は、細胞質からミトコンドリアの切断面(分裂サイト)にリクルート/集積化され、自己会合により収縮環を形成して膜を切断する。酵母では、Drp1はアダプタータンパク質Mdv1/Caf4を介して、ミトコンドリア膜タンパク質Fis1と相互作用して分裂サイトに集積する。しかし、哺乳動物細胞では、(1)Fis1の発現をRNA干渉(RNAi)で抑制しても、分裂サイトへのDrp1集積化には影響ないこと、(2)Mdv1/Caf4(アダプタータンパク質)相同遺伝子が見当たらないことから、哺乳動物細胞には酵母とは異なるDrp1集積化機構の存在が示唆されていた。最近私達は、哺乳動物細胞におけるミトコンドリア分裂サイトへのDrp1の集積化に、ミトコンドリア外膜タンパク質Mffが働くことを明らかにした。生化学的および細胞生物学的解析から、MffはDrp1よりも前にミトコンドリア膜上に不均一に存在するなど、分裂サイトの初期形成過程に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Cytoplasmic dynamin-related GTPase Drp1 is recruited to mitochondria and mediates mitochondrial fission. Although mitochondrial outer membrane (MOM) protein Fis1 is thought to be a Drp1 receptor, this has not been confirmed. To analyze the mechanism of Drp1 recruitment, we manipulated expression of mitochondrial fission and fusion proteins and demonstrated that (i) mitochondrial fission factor (Mff)-knockdown released the Drp1 foci from MOM accompanied by network extension, while Mff-overexpression stimulated mitochondrial recruitment of Drp1 accompanied by mitochondrial fission; (ii) Mff-dependent mitochondrial fission proceeded independent of Fis1; (iii) Mff mutant with plasma membrane-targeted CAAX motif directed Drp1 to the target membrane; (iv) Mff and Drp1 physically interacted in vitro and in vivo; (v) exogenous stimuli-induced mitochondrial fission and apoptosis were compromised by knockdown of Drp1 and Mff, but not Fis1; and (vi) conditional knockout of Fis1 in colon carcinoma cells revealed that it is dispensable for mitochondrial fission. Thus, Mff, but not hFis1, functions as an essential factor in mitochondrial recruitment of Drp1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核細胞に必須のオルガネラで、細胞分化、細胞病変、環境ストレス変化に応じて膜の分裂・融合を介してその形態を変化させる。近年、ミトコンドリアの形態と細胞の高次機能との関連が世界中で盛んに研究されつつある。細胞質に局在している Drp1 と呼ばれる高分子量 GTPase は、ミトコンドリア断片化に際して細胞質からミトコンドリア膜分裂サイトに集積しミトコンドリア膜を分断する。従って、ミトコンドリア分裂の分子機構を研究する上では、Drp1 のミトコンドリア膜分裂サイトへの集積過程の解析が極めて重要である。通常、膜の分裂には膜の屈曲を変化させることが必要である。最近、エンドサイトーシスに機能する Endophilin ファミリー蛋白質のひとつ Endophilin B1 がミトコンドリア膜分裂サイトで、膜の屈曲を変化させ Drp1 と共に膜分断に機能すると報告された。しかし、これらの因子がどのような機構で膜分裂サイトに集積するかについては不明である。

酵母において、Drp1 はミトコンドリア外膜上に存在する Mdv1 を介して、同じく外膜上に存在する Fis1 と相互作用することでミトコンドリア膜分裂サイトに集積し、その GTPase 活性による GTP の加水分解に伴いミトコンドリアを分断することが報告されている。しかしながら、哺乳類においては Fis1 の発現量を RNAi (RNA 干渉法) により抑制してもミトコンドリアの伸長は認められるものの、Drp1 のミトコンドリア膜への集積にはほとんど差異が見られないこと、さらに酵母 Mdv1 の哺乳類ホモログが見当たらないことなどから哺乳類独自の Drp1 膜集積化機構の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

近年、ミトコンドリア形態調節の研究は、基礎研究分野に留まらず、医学分野においても注目されつつある。神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病患者由来の繊維芽細胞では、通常より伸長したミトコンドリアの形態が観察され、Drp1 の発現量が正常値よりも著しく低下しているとの報告も出されている。私たちの研究室では、Drp1 によるミトコンドリア分裂の個体レベルでの生理的意義を解析するために、Drp1 遺伝子欠損マウスを作製した。Drp1 遺伝子欠損マウスでは、脳に顕著な発育不全が見られ、シナプ

スが形成されないという臨床病理学的所見が認められた。このことはミトコンドリアの分裂が、シナプス形成において非常に重要であることを示している。おそらくミトコンドリアの分裂は、シナプス形成部位へのエネルギー、あるいは脂質の効率的な供給に必要なミトコンドリアの運搬に極めて重要なのであろう。以上の観点からミトコンドリア形態調節機構の研究は、基礎研究分野への貢献は言うに及ばず、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の新たな診断法の開発、あるいは新しい治療法の開発にも大きな貢献をするものと考えられる。

そこで本応募研究課題ではミトコンドリア分裂実行因子 Drp1 のミトコンドリア分裂サイトへの集積化機構の分子レベルでの理解を目指し、(1) 単離ミトコンドリアを用いた Drp1 の *in vitro* 輸送系の構築と、(2) Drp1 のミトコンドリア分裂サイト集積化における Fis1 および Endophilin B1 の関与、さらに Drp1 の集積化における脂質成分の重要性を検討するため (3) Drp1 のミトコンドリア分裂サイト (Drp1 に結合している脂質) の膜脂質組成の解析を実施することでミトコンドリア分裂機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

ミトコンドリア膜切断に働くダイナミン様 GTPase である Drp1 のミトコンドリアへの局在に影響を及ぼすタンパク質の網羅的 RNAi スクリーニングを実施した。既知のミトコンドリア外膜タンパク質にたいする RNAi を実施して、Drp1 の局在変化を引き起す因子を検索した。変化の見られた因子をクローニングして過剰発現により Drp1 局在に及ぼす影響、あるいはミトコンドリア形態に及ぼす影響を検討した。また相互作用解析を実施してその作用機序の解明を進めた。またミトコンドリア分裂関連因子の遺伝子破壊細胞株を樹立してその遺伝子のミトコンドリア分裂に対する機能を確定させる。

4. 研究成果

申請者らは、分裂実行因子 Drp1 (GTPase) の脳特異的 KO マウスを作製し (出生直後に死亡)、ミトコンドリア分裂の脳神経系機能における役割を解析した。Drp1 KO マウスより単離した神経培養細胞では、巨大なミトコンドリアが認められ、軸索へのミトコンドリアの供給が阻害されていた。その結果、Drp1 KO 神経細胞では、シナプス形成能が著しく低下して

いることが判明した。すなわち、ミトコンドリア分裂が神経細胞におけるシナプス形成に重要であることを明らかにすることができた (Ishihara, Otera et al. NCB 2009)。本研究は、ミトコンドリア分裂が個体レベルでの発生・分化に重要であることを示す世界初の成果として高く評価された。

Drp1は、細胞質からミトコンドリアの切断面(分裂サイト)にリクルート/集積化して膜を切断すると考えられている。酵母では、Drp1はアダプタータンパク質Mdv1を介して、ミトコンドリア膜タンパク質Fis1と相互作用して分裂サイトに集積する。哺乳動物細胞では、酵母とは異なる集積化機構の存在が示唆されていたが、最近までその実体は不明であった。このような背景のもと申請者は、哺乳動物細胞におけるミトコンドリア分裂サイトへのDrp1の膜受容体として、Mff (*Mitochondrial fission factor*) が働くことを世界で初めて明らかにした (Otera et al. JCB 2010)。申請者は、Mffが一般的なミトコンドリア膜タンパク質が膜上に均一に存在するのは異なり、(1) 不均一なドット状に存在すること、(2) このドットはDrp1の局在と一致すること、(3) Mffのドット状の構造物はDrp1より先にミトコンドリア膜上に形成されることを明らかにした。本研究成果は、Mffが分裂サイトの初期形成過程に関わることを示唆しており高く評価された (In Focusおよび表紙に採択)。さらに興味深いことに、コンディショナルKO細胞を作製することにより、Fis1が、哺乳動物細胞におけるミトコンドリア分裂に必要なことを示した。本研究は哺乳動物細胞独自のミトコンドリア分裂機構として高く評価された (In Focusに採択: Mitochondria help dynamins get a grip. JCB 2011 Vol. 191)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Discovery of membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. Otera H, Mihara K. *Small GTPases* (in press). (査読有り)

Molecular Mechanism and Physiologic Functions of Mitochondrial Dynamics. Otera H, Mihara K. *J Biochem.* Jan 13: 149:241-251 (2011). (査読有り)

Mff is an essential factor for recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells.

Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. *J. Cell. Biol.* Dec 13(191), 1141-1158 (2010). “In Focus”ならびに表紙に選出 (査読有り)

Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto YI, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K. *Nat Cell Biol.* Aug 11(8):958-966 (2009). (査読有り)

[学会発表] (計3件)

大寺秀典、三原勝芳、ミトコンドリア分裂因子 Mff のミトコンドリア分裂における役割、日本細胞生物学会、2010、5、21。

大寺秀典、三原勝芳、ミトコンドリア分裂因子 Mff～ミトコンドリア分裂/アポトーシスにおける役割、特定領域研究<蛋白質の社会>班会議、2009、11、12。

大寺秀典、三原勝芳、Physiological significance of mitochondrial fission in apoptosis progression、日本分子生物学会大会、2009、12、11。

[図書] (計2件)

膜貫通ドメインによる膜タンパク質の選別輸送 大寺秀典、三原勝芳、瀬戸口喜代子 実験医学 Vol.28 No.13 (2010)

ミトコンドリア膜構造変化とアポトーシス 大寺秀典、岡敏彦 細胞工学 Vol. 29 No.5 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/people/otera.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大寺秀典 (OTERA HIDENORI)

九州大学医学研究院 助教

研究者番号：40380612

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：